

시스타민 코어 폴리아미도아민 덴드리머에 펩티드와 감마 아미노부티르산의 도입을 통한 새로운 유전자 전달체 연구

박혜원 · 유광식 · 송수정 · 최준식[†]

충남대학교 자연과학대학 생화학과

(2015년 2월 6일 접수, 2015년 3월 17일 수정, 2015년 3월 25일 채택)

Conjugation of Peptide to Cystamine Core Polyamidoamine with γ -Aminobutyric Acid for Gene Delivery

Hye Won Park, Gwang Sig Yu, Su Jeong Song, and Joon Sig Choi[†]

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Gung-dong 220, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received February 6, 2015; Revised March 17, 2015; Accepted March 25, 2015)

초록: 유전자 전달체 가운데 비바이러스성 전달체인 PAMAM 덴드리머의 일종인 cPAMAM G4를 사용하여 분자의 표면에 GABA와 히스티딘, 아르기닌을 도입해 새로운 유전자 전달체를 합성하였다. cPAMAM G4-GABA-HR 최종 합성물은 핵자기 공명 분광기를 이용해 합성물을 확인하였다. 전기영동을 이용하여 폴리머와 pDNA간의 결합력을 확인하였고, 폴리머와 DNA의 복합체에 환원제를 처리하여 폴리머의 pDNA 방출 능력을 확인하였다. 나노 입자 분석기와 원자력 현미경을 이용하여 pDNA와 폴리머 복합체의 크기와 모양을 분석하였다. HeLa 세포주를 이용한 WST-1 assay를 통해 폴리머의 세포 독성을 확인하였고, 동일한 세포주를 이용한 luciferase assay를 통해 유전자 전달 효율성을 확인하였다.

Abstract: Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer are well known non-viral vectors for gene delivery application. Especially, PAMAM conjugated with amino acids have enhanced cell uptake capability and low cytotoxicity compared to other non-viral, vectors. Moreover cystamine core PAMAM has an ability to degrade inside low pH of endosome leading to ease release of biomolecules. In present work, we designed γ -amino butyric acid (GABA), histidine, arginine modified cystamine core PAMAM. GABA has four carbon chains that plays a role as flexible linkers, hence easy interaction with cell membrane. cPAMAM-GABA-HR synthesis was confirmed by ¹H NMR. We performed gel retardation assay, DNA release phenomenon of cystamine core PAMAM using DTT. We measured size of polyplex by DLS and AFM. Cytotoxicity was examined by WST-1 assay and transfection efficiency was confirmed using reporter plasmid in HeLa cells.

Keywords: cationic polymer, PAMAM dendrimer, transfection, amino acid.

서 론

유전자 치료란 유전자 발현체계를 통해서 생체 내 질병 부위에 치료용 외부 유전자를 전달하고 형질 발현시켜 유전적 결함을 치료하는 치료법이다. 손상되었거나 문제가 발생한 유전자는 새롭게 도입된 유전자에 의해 대체된다. 새로운 유전자는 정상적인 단백질 또는 치료용 단백질을 발현함으로써 질병을 치료할 수 있게 된다.¹⁻³

유전자 치료는 유전자 자체로는 세포 내에 존재하는 많은 방해요소들에 의해 쉽게 분해되어 유전자 전달이 쉽지 않기

때문에 유전자 전달체를 필요로 한다. 유전자 전달체는 치료용 외부 유전자를 세포 내로 도입시킬 수 있는 물질로, 바이러스성 전달체와 비바이러스성 전달체로 나뉜다. 바이러스성 전달체는 렌티 바이러스, 아데노 바이러스와 같은 바이러스를 이용하는 것으로, 유전자 전달 효율성은 높지만 독성이 강해 임상에 적용했을 때 면역반응을 일으켜 부작용 발생이 높은 등 안전성에 대한 문제점이 제기되고 있다. 반면, 비바이러스성 전달체는 덴드리머, 양이온성 리포솜과 같은 고분자 물질을 이용하는 것으로,^{4,9} 유전자 전달 효율성은 다소 떨어지지만 독성과 면역반응에 따른 부작용 발생의 가능성도 낮아 바이러스성 전달체가 갖는 문제점에 비해 훨씬 안전하여 최근 활발한 연구가 이뤄지고 있다.¹⁰

본 연구에서 주목한 비바이러스성 전달체인 디에틸렌 코어

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: joonsig@cnu.ac.kr

©2015 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

폴리아미도아민(polyamidoamine, PAMAM) 분자는 잘 알려진 양이온성 덴드리머이다. PAMAM 분자의 구조는 내부 사슬이 나뭇가지의 모양으로 연결되어 있으며, 둥근 공모양의 삼차원 구조로 가장 바깥쪽은 64개의 아민기로 이뤄져 있다. 이로 인해 양이온성 PAMAM 덴드리머의 표면은 DNA의 음이온성과 정전기적인 인력으로 쉽게 결합하여 복합체를 형성한다. 이러한 PAMAM 분자는 다른 종류의 비바이러스성 전달체에 비해 상대적으로 낮은 독성과 우수한 유전자 전달 효율성을 가진 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹³

본 연구에서는 다른 유형의 PAMAM 덴드리머인 시스타민 코어 폴리아미도아민 4차(cystamine core polyamidoamine generation4, cPAMAM G4) 분자를 사용하였다. 이 분자는 디에틸렌 코어인 PAMAM 분자와는 달리 디설피드 코어로 되어 있어 세포 내로 유입되었을 때 글루타치온(glutathione, GSH)과 같은 환원제로 인해 쉽게 분해되어 세포질 내로의 유전자 방출을 용이하게 한다(Figure 1).¹⁴ 여기에 다양한 기능성을 부여하기 위해 cPAMAM 최외각의 아민기에 감마 아미노부티르산(γ -aminobutyric acid, GABA)과 아미노산인 히스티딘, 아르기닌을 순서대로 도입하였다. 먼저, GABA는 4개의 탄소 사슬을 갖고 있어 구조적 유연성을 증가시켜 히스티딘, 아르기닌 단위에 유연성을 부여해 효과를 극대화시킬 수 있다.¹⁵ 히스티딘(Histidine, H)은 세포 내 유입 과정을 통해 생성된 엔도솜에서 높은 양성자 스펙트럼 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 엔도솜 막의 용해를 향상시켜 유전자가 세포질로 이동하는데 도움을 줄 수 있다.¹⁶ 아르기닌(arginine, R)은 양이온성을 부여해 세포 침투성을 높이는 물질로 잘 알려져 있다. 이를 표면에 도입시킴으로써 유전자 전달체는 치

료가 필요한 세포에 잘 침투하여 원활한 세포 내 유입을 가능하게 한다.^{17,18}

cPAMAM G4 덴드리머를 기반으로 한 새로운 유전자 전달체 cPAMAM G4-GABA-HR 고분자는 액체상 펩티드 합성법을 통하여 합성하였으며 ¹H NMR을 통해 합성물을 확인하였다. 전기영동을 이용하여 DNA와 고분자의 복합체 형성과, 환원제에 의한 DNA의 방출이 원활하게 이뤄짐을 확인하였다. 이를 바탕으로 dynamic light scattering(DLS)와 atomic force microscope(AFM)을 통해 복합체의 크기와 모양을 측정하였다. 합성된 폴리머의 농도에 따른 세포 독성을 확인하기 위하여 WST assay를 수행하였으며 luciferase assay를 이용한 유전자 발현 정도의 측정을 통해 유전자 전달 효율성을 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. Cystamine core polyamidoamine generation 4 (cPAMAM G4)와 *N,N*-dimethylformamide(DMF), triisopropylsilan(TIS), trifluoroacetic acid(TFA), *N,N*-diisopropylethylamine(DIPEA), DL-dithiothreitol(DTT), piperidine, 25 kDa polyethylenimine(PEI25kD), ethidium bromide(EtBr)는 Sigma aldrich(Seoul, Korea)에서 구매하였다.

Fmoc-Arg(pbf)-OH와 *N*-hydroxybenzotriazole(HOBt), 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium(HBTU)는 Anaspec(San Jose, USA)에서 구매하였고, Fmoc- γ -Abu-OH와 Fmoc-His(Trt)-OH는 Novabiochem(San Diego, USA)에서 구매하였다. Fetal bovin serum(FBS)와 dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS), dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), 100X antibiotic-antimycotic agent는 Gibco(Gaithersburg, MD, USA)에서 구매하였다. Diethyl ether는 JUNSEI(Tokyo, Japan)에서 구매하였고, Micro BCA™ Protein assay kit는 Thermo scientific(MA, USA)에서 구매하였다. Ez-Cytox reagent는 Daeil Lab Service(Seoul, Korea)에서 구매하였다.

cPAMAM G4-GABA-HR의 합성. cPAMAM G4-GABA-HR 폴리머의 합성은 액체상 펩티드 합성법을 이용하여 수행하였다. cPAMAM G4와 Fmoc- γ -Abu-OH, HOBt, HBTU, DIPEA는 1:4:4:8의 몰비율로 DMF에서 16시간 이상 상온 반응으로 합성하였다. 합성 후, 차가운 디에틸에테르에 합성물을 침전하였다. GABA의 보호기인 Fmoc은 피페리딘 용액(피페리딘:DMF=30%:70%)을 이용하여 상온에서 1시간 30분 동안 제거하였다. 제거 후, 차가운 디에틸에테르에 다시 침전하였다. 위와 같은 방법으로 Fmoc-His(Trt)-OH와 Fmoc-Arg(Pbf)-OH를 HOBt, HBTU, DIPEA와 동일한 몰비율로 앞선 합성물과 함께 DMF에서 16시간 이상 반응시키고 Fmoc 보호기를 제거해 침전하였다. 히스티딘의 Trt, 아르기닌의 Pbf

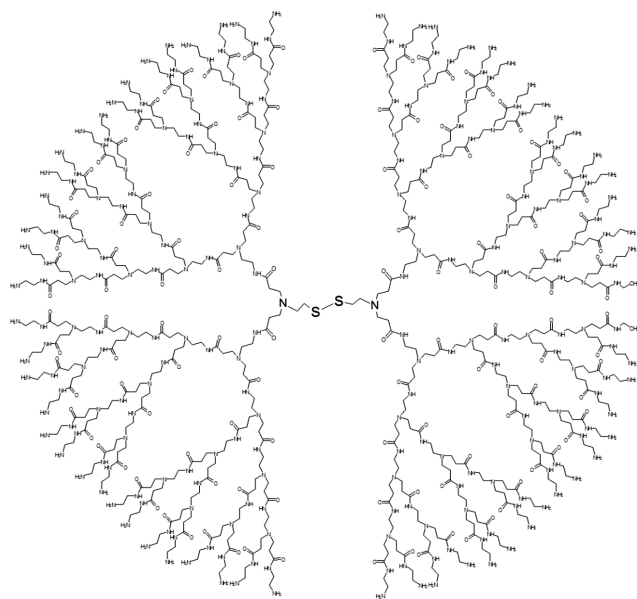


Figure 1. Structure of cystamine core polyamidoamine generation 4(cPAMAM G4).

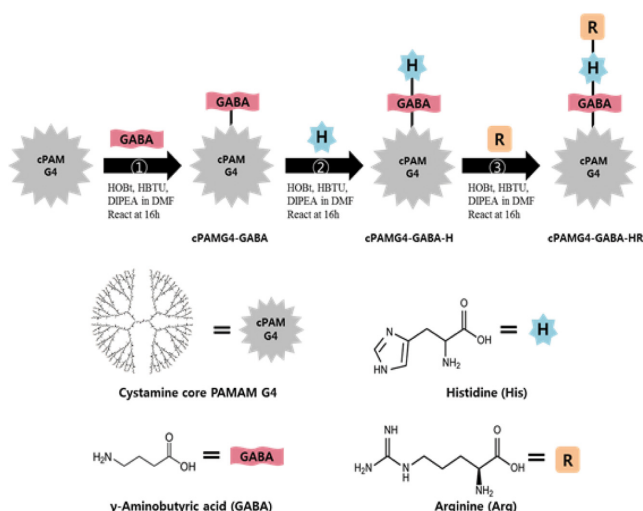


Figure 2. Synthesis of cPAMAM G4-GABA-HR.

보호기는 TFA 용액(TFA:TIS:D.W=95%:2.5%:2.5%)으로 상온에서 6시간 동안 반응시켜 침전하였다. 합성물은 24시간 이상 투석(MWCO 3500)하여 순도를 높였다. 투석 후 동결 건조하여 cPAMAM G4-GABA-HR의 최종 합성물을 얻었다 (Figure 2).

전기영동을 이용한 cPAMAM G4-GABA-HR와 플라스미드 DNA의 Complex Test. 폴리머와 pDNA(pCN-luc)의 중량비에 따른 결합력을 알아보기 위해 전기영동을 수행하였다. HEPES buffer(125 mM HEPES, pH 7.4) 상에서 폴리머와 pDNA는 1:1, 2:1, 4:1, 8:1의 중량비로 준비한 후, 30분 동안 complex한다. 0.7% agarose에 EtBr 0.5 µg/µL를 처리하여 100 V에서 30분 동안 전기영동하였다.

전기영동을 이용한 플라스미드 DNA의 Release Test. cPAMAM G4-GABA-HR와 plasmid DNA(pCN-luc) 결합체에 환원제를 처리했을 때 폴리머에 결합되어 있던 pDNA가 원활하게 방출되는지 알아보기 위해 pDNA release test를 수행하였다. HEPES buffer 상에서 폴리머, pDNA의 complex test와 동일한 조건으로 complex하여 준비하였다. 그 다음, 환원제인 DTT 25 mM을 complex한 시료에 처리한 후 30분 동안 반응시킨다. 0.7% agarose에 EtBr 0.5 µg/µL를 처리하여 100 V에서 30분 동안 전기영동하였다.

나노 입자 분석기를 이용한 폴리머의 크기 측정. 폴리머와 pDNA는 HEPES buffer 상에서 4:1의 중량비로 준비한 후, 30분 동안 complex한 후 ELS-Z(Otsuka electronics, Otsuka, Japan)로 폴리머의 입자 크기를 측정하였다.

원자력 현미경을 이용한 폴리머 입자의 모양과 크기 측정. 나노 입자 분석기를 이용한 폴리머의 크기 측정과 같은 방법으로 시료를 준비하여 유리판에 떨어트려 2시간 동안 천천히 상온에서 말린 후 입자의 모양과 크기를 측정하였다.

세포 독성 실험. cPAMAM G4-GABA-HR의 농도에 따른

세포 독성을 알아보기 위해 WST assay를 수행하였다. 세포는 human epithelial carcinoma 세포인 HeLa 세포주를 이용하였다. 96 well plate에 10만개/well의 세포를 37 °C, 5% CO₂에서 배양한다. 대조 물질로는 PEI25kD, PAMAM G4, cPAMAM G4를 사용했으며, 대조 물질과 cPAMAM G4-GABA-HR 용액을 배양한 세포에 각각 적절한 농도 별로 처리한 후, 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well에는 10 µL의 Ez-Cytox reagent(daeil lab service, Seoul, Korea)을 처리하여 다시 37 °C에서 2시간 배양하였다. ELIZA (VERSAmass, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유전자 전달 효율 실험. cPAMAM G4-GABA-HR의 세포 내 유전자 전달 효율성을 알아보기 위해 Human epithelial carcinoma 세포인 HeLa 세포주를 이용하였다. 24 well plate에 20만/well 세포를 37 °C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양한다. 대조 물질로 사용한 PEI25kD는 pDNA(pCN-luc)와 중량비 2:1로 준비하고 PAMAM G4, cPAMAM G4는 pDNA와 중량비 4:1로 준비하였다. cPAMAM G4-GABA-HR는 pDNA와 중량비 4:1, 8:1, 12:1, 16:1로 준비하여 30분 동안 complex하였다.

각 well에 준비한 complex 시료를 처리하여 37 °C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 상층의 배양액을 제거하고, reporter lysis buffer(Promega)를 처리하여 30분 동안 반응하였다. 각각의 상층액에 luciferin agent(Promega)를 처리하여 Lumat LB 9507(Berthold Technology, Bad Wildbad, Germany)로 광도를 측정하였다. 발현된 단백질의 정량은 Micro BCA™ Protein Assay(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 2시간 반응 후, ELIZA(VERSAmass, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 토론

cPAMAM G4-GABA-HR의 합성 확인. 액체상 펩티드 합성법을 이용하여 cPAMAM G4-GABA-HR를 합성하였다. 합성 후 정제하여 수득한 폴리머의 합성을 입증하기 위해 400 MHz의 핵자기 공명 분광기를 이용하였다. 먼저, cPAMAM G4는 2.24 ppm 값을 갖는 것을 확인하였다. GABA는 1.61과 1.90 ppm 값을 갖는 것을 확인하였고, 히스티딘은 3.66, 6.80, 7.59 ppm 값을, 아르기닌은 1.45와 4.32 ppm 값을 갖는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 cPAMAM G4의 ppm 값인 2.24를 기준으로 하여 합성물을 계산한 결과, GABA와 히스티딘, 아르기닌 모두 99% 이상의 합성률을 갖는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3).

전기영동을 이용한 cPAMAM G4-GABA-HR와 플라스미드 DNA의 Complex Test. cPAMAM G4-GABA-HR 폴리

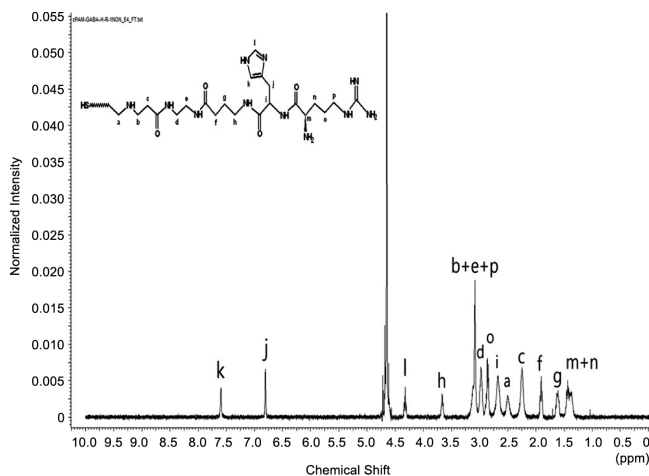


Figure 3. ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) result of cPAMAM G4-GABA-HR.

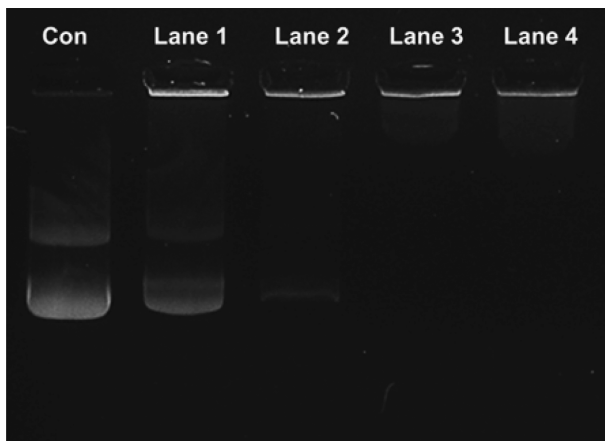


Figure 4. Agarose gel retardation assay result of cPAMAM G4-GABA-HR and plasmid DNA polyplex. Plasmid DNA only (Con), weight ratio of polymer:DNA = 1:1 (Lane 1), 2:1 (Lane 2), 4:1 (Lane 3), 8:1 (Lane 4).

머가 pDNA(pCN-luc)와 결합체를 형성하는지 확인하기 위하여 전기영동을 이용한 complex test를 수행하였다. 폴리머와 pDNA는 1:1, 2:1, 4:1, 8:1(중량비)로 준비하여 complex를 형성하도록 30분 동안 반응하였다. 그 결과, 중량비 2:1부터 서서히 complex를 이루는 것을 확인할 수 있었고, 대조군 대비 Lane 3의 중량비 4:1부터 완벽한 결합체를 이루는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

전기영동을 이용한 플라스미드 DNA의 Release Test. cPAMAM G4-GABA-HR, pDNA(pCN-luc) 결합체가 실제로 환원제에 의해 분해되어 폴리머에 결합되어 있는 pDNA를 방출하는지 확인하기 위해 전기영동을 이용한 pDNA release test를 수행하였다. 폴리머와 pDNA는 complex test에서 복합체를 형성하기 시작하는 2:1과 완벽한 복합체를 형성한 4:1,

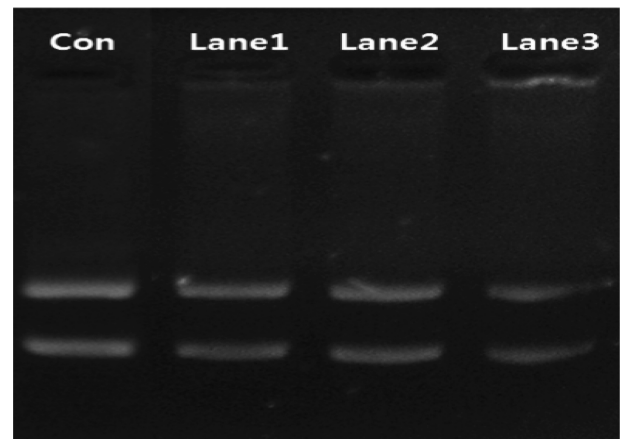


Figure 5. Agarose gel plasmid DNA release test result of cPAMAM G4-GABA-HR and plasmid DNA polyplex. Plasmid DNA only (Con), weight ratio of polymer:DNA = 2:1 (Lane 1), 4:1 (Lane 2), 8:1 (Lane 3).

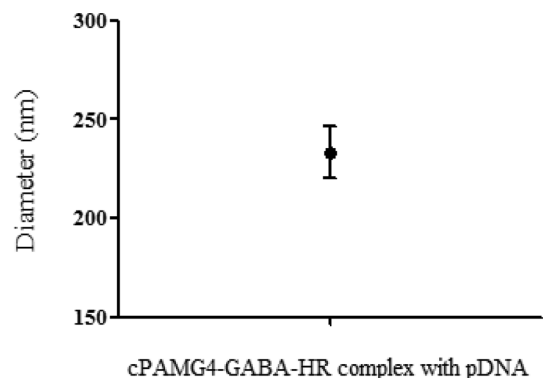


Figure 6. Dynamic light scattering measurement result of cPAMAM G4-GABA-HR and plasmid DNA polyplex (weight ratio of polymer:DNA = 4:1).

8:1(중량비)로 준비하여 complex를 형성하도록 반응시켰다. 그 다음, cPAMAM의 디설피드 결합이 분해될 수 있도록 환원제인 DTT 25 mM을 처리하였다. 그 결과, complex test에서 복합체를 형성하기 시작했던 2:1 조건과 완벽한 복합체를 형성했던 4:1 모두 대조군 대비 거의 유사한 정도의 pDNA가 방출됨을 확인할 수 있었고, 8:1 조건에서는 방출된 pDNA의 양이 다소 감소하는 결과를 확인하였다(Figure 5).

나노 입자 분석기를 이용한 복합체의 크기 측정. Complex test와 release test를 통해 완벽히 결합하기 시작하고 대조군 대비 거의 동일한 양의 pDNA를 방출하였던 폴리머:pDNA=4:1(중량비) 복합체의 크기를 확인하기 위해 나노 입자 분석기를 이용하였다. 그 결과, 폴리머와 pDNA 복합체는 평균 228 nm의 크기를 갖는 나노 크기의 입자임을 확인할 수 있었다. 1000 nm 이상의 크기를 갖는 pDNA가 운반체와 정전기적으로 결합하였을 때, 효과적으로 응축된다는 것 또한 알

수 있었다(Figure 6).

폴리머 입자의 모양과 크기 확인을 위한 원자력 현미경 실험. Complex test를 통해 확인한 폴리머, pDNA 복합체의 모양을 확인하기 위해서 원자력 현미경을 이용한 복합체 입자 모양을 측정하였다. 복합체는 완벽히 결합하기 시작하며 대조군 대비 거의 동일한 양의 pDNA를 방출하였던 폴리머:pDNA=4:1(중량비)로 준비하여 complex를 형성하도록 30분 동안 반응시켰다. Glass에 떨어트려 2시간 동안 천천히 상온에서 말린 후 측정하였다. 그 결과 평균 100~200 nm의 둥그란 구형의 입자임을 확인할 수 있었다(Figure 7).

세포 독성 실험. cPAMAM G4-GABA-HR의 농도에 따른 세포 독성 정도를 알아보기 위해 HeLa 세포주를 이용한 WST assay를 수행하였다. 대조 물질인 PEI25kD, cPAMAM G4와 cPAMAM G4-GABA-HR는 각각 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 준비하여 세포에 농도 별로 처리하였다. Ez-Cytox reagent(Daeil lab service, Seoul, Korea)를 더해 ELIZA (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 세포 독성이 매우 강하다고 알려진 PEI25kD는 매우 높은 세포 독성을 보임을 확인하였다. cPAMAM G4의 경우, 농도가 증가할수록 PEI25kD보다는 비교적 낮은 세포 독성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. cPAMAM G4-GABA-HR의 경우, 농도가 증가할수록 세포 독성이 조금씩 증가하지만 PEI25kD와 비교했을 때 현저히 낮은 독성을 보였다. 이러한 결과를 통해 cPAMAM G4에 GABA-HR을 도입함으로써 세포 독성이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 8).

유전자 전달 효율 실험. cPAMAM G4-GABA-HR의 세포 내 유전자 전달 효율성을 알아보기 위해 luciferase assay와

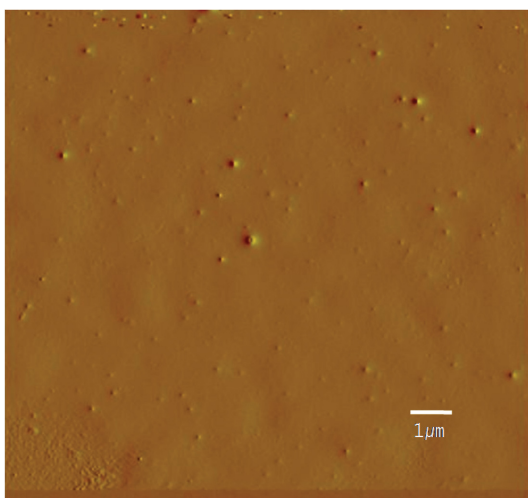


Figure 7. Atomic force microscopy result of cPAMAM G4-GABA-HR and plasmid DNA polyplex (weight ratio of polymer:DNA = 4:1).

BCA assay를 수행하였다. 세포 독성 실험과 마찬가지로 HeLa 세포주를 이용하였다. 대조 물질로는 PEI25kD(폴리머:pDNA=2:1, 중량비), PAMAMG4, cPAMAM G4(폴리머:pDNA=4:1, 중량비)로 준비하였고, cPAMAM G4-GABA-HR(폴리머:pDNA=4:1, 8:1, 12:1, 16:1, 중량비)로 준비해 세포에 처리하였다. Lumat LB 9507(Berthold Technology, Bad Wildbad, Germany)로 luciferin을 이용해 광도를 측정한 결과, 유전자 전달 효율이 매우 높다고 알려진 PEI25kD는 예상대로 높은 효율을 보였다.

cPAMAM G4-GABA-HR의 경우, 폴리머:pDNA=12:1(중량

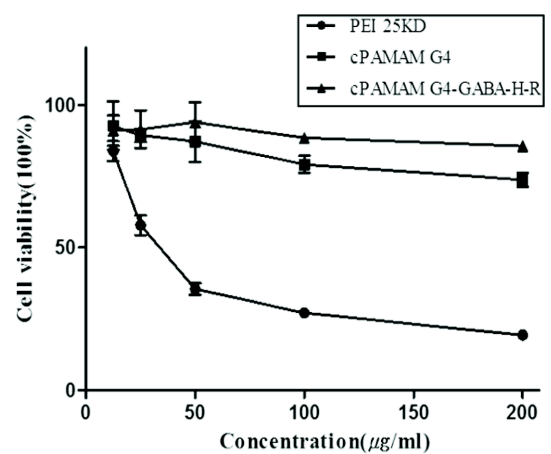


Figure 8. Cytotoxicity assay result of cPAMAM G4-GABA-HR in HeLa cells.

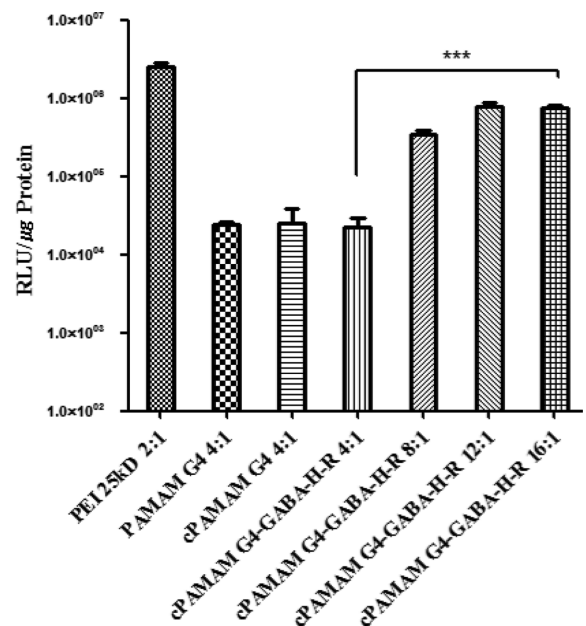


Figure 9. Luciferase assay result of cPAMAM G4-GABA-HR in HeLa cells at each of weight ratio. Data are shown as mean $\pm$ standard deviation (n=3). *** p <0.001.

비)까지는 복합체의 폴리머 질량이 증가할수록 유전자 전달 효율도 증가하는 경향을 보였으며 중량비 16:1부터는 유전자 전달 효율이 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 선행 연구에 따르면, PAMAM G3와 시스타민 코어 PAMAM G3의 경우 중량비 증가에 따른 유전자 전달 효율의 유의미한 증가가 없었다.¹⁹ cPAMAM G4-GABA-HR의 경우, 폴리머: pDNA=12:1에서 가장 높은 수준의 유전자 발현 효율성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 또한 폴리머의 비율이 증가할수록 양이온성이 증가하여 더욱 효율적으로 pDNA와 결합하고 그에 따라 유전자의 발현 효율도 증가하지만, 폴리머의 양이 16:1 중량비가 되더라도 그 효율은 더 증가하지 않고 비슷한 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다. 따라서 cPAMAM G4-GABA-HR와 pDNA의 중량비 12:1이 가장 적절한 조건의 비율이며 cPAMAM G4에 GABA와 히스티딘, 아르기닌 unit을 도입함으로써 향상된 유전자 전달 및 발현 효율을 갖게 됨을 알 수 있었다(Figure 9).

결 론

액체상 펩티드 합성법을 통해 비바이러스성 전달체의 일종인 PAMAM 덴드리머를 기반으로 새로운 유전자 전달체인 나노 크기의 cPAMAM G4-GABA-HR 폴리머를 제조하였다.

PAMAM 덴드리머 분자는 유전자를 세포로 운반할 수 있는 훌륭한 유전자 전달체로 알려져 있다. 그 중, cPAMAM은 PAMAM의 일종으로써 pDNA와 정전기적 인력을 통해 결합한다. 유전자 전달체는 주로 내포작용의 원리로 세포 내부로 들어간다고 알려져 있는데, 본 연구에서 도입한 GABA는 긴 탄소사슬을 가지고 있어 히스티딘, 아르기닌 unit에 유연성을 부여하고 아르기닌은 세포 막 침투성을 높여 세포막 함입 후 히스티딘의 완충작용에 의해 엔도솜의 불안을 가중시켜 세포 내에서의 엔도솜 탈출을 도울 수 있게 된다.

합성한 cPAMAM G4-GABA-HR은 핵자기 공명 분광기를 통해 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. 폴리머와 pDNA의 complex test와 환원제에 의한 pDNA release test를 통해 cPAMAM G4-GABA-HR 폴리머는 유전자와 잘 결합하고 환원제에 의해 분해되어 pDNA를 방출하는 기능을 갖는 것을 알 수 있었다. 나노 입자 분석기와 원자력 현미경 실험을 통해 폴리머와 pDNA의 복합체 입자는 둥근 공 모양이고 크기는 평균 200 nm의 입자임을 확인할 수 있었다.

Human epithelial carcinoma 세포인 HeLa 세포주를 이용해 합성된 폴리머의 농도별 독성과 유전자 전달 효율을 확인한 결과, 대조물질인 PEI25kD와 비교했을 때 cPAMAM G4에 GABA-HR을 도입함으로써 세포에 미치는 독성이 현저히 낮아짐을 확인할 수 있었다. 이를 통해 PEI25kD와 비슷한 수

준의 높은 유전자 전달 효율을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

과거, 일부 희귀 유전질환에만 국한되어있던 유전자 치료는 최근 종양과 심혈관 질환, 후천성 면역 결핍증의 치료에도 적용되고 있다. cPAMAM G4를 이용한 생체 적합한 새로운 유전자 전달체의 개발을 통해 다기능성 유전자 전달 시스템의 구축과 많은 질병에 대한 유전자 치료가 가능할 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글: 이 연구는 2014 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

참 고 문 헌

1. T. Friedmann, *Trends Biotechnol.*, **11**, 156 (1993).
2. R. C. Rao and D. N. Zacks, *Dev. Ophthalmol.*, **53**, 167 (2014).
3. T. Zhang, *Curr. Drug Deliv.*, **11**, 233 (2014).
4. R. J. Cristiano, *Front. Biosci.*, **3**, D1161 (1998).
5. N. Nayercrossadat, T. Maedeh, and P. Ali, *Adv. Biomed. Res.*, **1**, 27 (2012).
6. T. B. Lentz, S. J. Gray, and R. J. Samulski, *Neurobiol. Dis.*, **48**, 179 (2012).
7. J. Hewinson, J. F. R. Paton, and S. Kasparov, *Methods Mol. Biol.*, **998**, 65 (2013).
8. T. Dutta, N. K. Jain, N. A. J. McMillan, and H. S. Parekh, *Nanomedicine*, **6**, 25 (2010).
9. M. R. Almofiti, H. Harashima, Y. Shinohara, A. Almofiti, Y. Baba, and H. Kiwada, *Arch. Biochem. Biophys.*, **410**, 246 (2003).
10. Y. Hattori and Y. Maitani, *Curr. Drug Deliv.*, **2**, 243 (2005).
11. A. R. Menjoge, R. M. Kannan, and D. A. Tomalia, *Drug Discov. Today*, **15**, 171 (2010).
12. N. Malik, R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus, and R. Duncan, *J. Contr. Rel.*, **65**, 133 (2000).
13. M. L. Patil, M. Zhang, S. Betigeri, O. Taratula, H. He, and T. Minko, *Bioconj. Chem.*, **19**, 1396 (2008).
14. H. Neumann and R. A. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 354 (1967).
15. G. S. Yu, H. N. Yu, Y. H. Choe, S. J. Son, T. H. Ha, and J. S. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **32**, 651 (2011).
16. A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, and H. J. Haisma, *J. Contr. Rel.*, **151**, 220 (2011).
17. I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J. C. Simpson, A. T. Jones, Y. Sugiura, and S. Futaki, *Mol. Ther.*, **10**, 1011 (2004).
18. J. R. Maiolo, M. Ferrer, and E. A. Ottinger, *Biochim. Biophys. Acta*, **1712**, 161 (2005).
19. G. S. Yu, Y. M. Bae, J. Y. Kim, J. Han, K. S. Ko, and J. S. Choi, *Macromol. Res.*, **20**, 1156 (2012).